

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-103933

(43) 公開日 平成7年(1995)4月21日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 27/327

G 0 1 N 27/ 30

3 5 3 B

3 5 3 R

3 5 3 P

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平5-244281

(22) 出願日 平成5年(1993)9月30日

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 山本 智浩

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 池田 信

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 吉岡 俊彦

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 東島 隆治 (外1名)

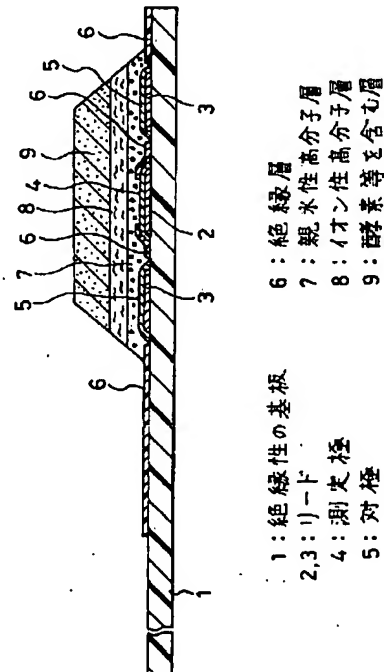
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【要約】

【目的】 より短時間で、高精度な測定ができるバイオセンサを提供する。

【構成】 絶縁性基板上的測定極および対極を含む電極系と、電極系上に配置されたイオン性高分子層と、これらと接してまたは分離されて配置された電子受容体および酵素とを具備するバイオセンサ。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 絶縁性の基板と、前記絶縁性の基板上に形成された測定極および対極を有する電極系と、前記電極系上に配置されたイオン性高分子層と、前記絶縁性の基板上に接してあるいは空間を介して配置された酵素と、前記絶縁性の基板上に接してあるいは空間を介して配置された電子受容体を具備することを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 絶縁性の基板と、前記絶縁性の基板上に形成された測定極および対極を有する電極系と、前記電極系上に配置された反応層を具備し、前記反応層が少なくともイオン性高分子、酵素および電子受容体を含むことを特徴とするバイオセンサ。

【請求項3】 前記反応層が親水性高分子を含む請求項2に記載のバイオセンサ。

【請求項4】 前記反応層が親水性高分子を主な構成要素とする層状の部位とイオン性高分子を主な構成要素とする層状の部位とを含む請求項3に記載のバイオセンサ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、試料中の特定成分について、迅速かつ高精度な定量を簡便に実施することのできるバイオセンサに関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく簡易に定量しうる方式として、次のようなバイオセンサが開示されている（特開平3-202764号公報）。図5は従来のバイオセンサの一例を示す断面図である。絶縁性の基板31上にスクリーン印刷等の方法で測定極33および対極32からなる電極系を形成し、さらに、絶縁層34を形成した後に、上記電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体からなる酵素反応層35を形成したものである。基質を含む試料液を酵素反応層35上へ滴下すると、酵素反応層35が溶解し、基質が酵素と反応して酸化され、これに伴い電子受容体が還元される。酵素反応終了後、この還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めるものである。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】上記のような従来構成のバイオセンサにおいては、個々のセンサの応答特性を揃えることが難しく、測定値のばらつきが大きいという課題を有していた。測定値のばらつきを緩和する手段としては、測定時間を長く設定することも有効であるが、使い勝手からすると必ずしも良策とはいえない。上記課題は、特にバイオセンサを使い捨てにする場合には重大である。本発明は、このような問題点を解決するもので、迅速に高精度な定量が可能なバイオセンサを提供す

るものである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために本発明は、絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる電極系を設け、前記電極系上に少なくともイオン性高分子を含む層を配置し、さらにこれらと接してあるいは空間を介して酵素および電子受容体を備えたバイオセンサを提供する。

## 【0005】

10 【作用】上記構成によって、電極と電子受容体の相互作用を円滑にし、応答電流値の増加をもたらす、より高精度な応答を迅速に得ることを可能とする。また、個々のセンサの応答値のばらつきを小さくする効果を同時に発現する。

## 【0006】

【実施例】以下、本発明を実施例により説明する。

【実施例1】バイオセンサの一例として、コレステロールセンサについて説明する。図1は本発明のバイオセンサの一実施例として作製したコレステロールセンサのうちカバーおよびスペーサを除いた断面模式図であり、図2は同コレステロールセンサのうち反応層を除いた分解斜視図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3を形成する。さらに、印刷法により、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストからなる測定極4、対極5を含む電極系および絶縁性ペーストからなる絶縁層6を形成する。絶縁層6は、測定極4および対極5の露出部分の面積を一定とし、かつリードを部分的に覆っている。

30 【0007】このようにして電極部分を作製した後、親水性高分子としてカルボキシメチルセルロース（以下CMCと略す）の0.5wt%水溶液を電極系表面に滴下し、50℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させてCMC層7を形成し、続いて前記CMC層7の表面に、イオン性高分子としてポリリジンの0.1wt%水溶液を滴下し、50℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させてポリリジン層8を形成する。CMC層上にポリリジンの水溶液を滴下すると、CMC層は溶解し、一部混合された状態となるが、攪拌をとまなわないため完全な混合状態とはならない。さらに、前記ポリリジン層8上に、酵素としてコレステロールエステラーゼ（EC3.1.1.3；以下ChEと略す）、コレステロールオキシダーゼ（EC1.1.3.6；以下ChODと略す）および電子受容体としてフェリシアン化カリウムをリン酸緩衝液に溶解させた混合水溶液を滴下し、40℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させてChE、ChODおよびフェリシアン化カリウムを含む層9を形成する。この層9の形成に際しても一部層8と混合された部が生じる。

40 【0008】上記の手順にて反応層を形成した後、カバー12およびスペーサー11を図2中、一点鎖線で示す

ような位置関係をもって接着する。カバーを装着することによって、試料液はセンサ先端の試料供給孔13に接触させるだけの簡易操作で容易に反応層部分へ導入される。試料液の供給量は、カバーとスペーサーによって生じる空間容積に依存するため、あらかじめ定量する必要はない。

【0009】こうして作製したコレステロールセンサに試料液としてコレステロール及びコレステロールエステルを含む標準液3 $\mu$ lを試料供給孔より供給し、3分後に対極を基準にして測定極にアノード方向へ+0.5Vのパルス電圧を印加し、5秒後の電流値を測定した。試料液が反応層へ到達すると、ChE、ChODおよびフェリシアン化カリウムを含む層9が溶解する。試料液中のコレステロールエステルはChEによってコレステロールに変化し、コレステロールはChODによって酸化され、そこで移動した電子によってフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。このようにして生じたフェロシアン化カリウムは、ポリリジン層8およびCMC層7を経て電極表面近傍に移動し、上記のパルス電圧の印加により酸化され、このときの酸化電流が電極系を介して得られる。この電流値は試料中に含まれるコレステロールとコレステロールエステルの濃度の合計（以下、全コレステロール濃度と記す）に対応した。試料液中の全コレステロール濃度と上記コレステロールセンサの応答の間には、直線関係が得られ、ポリリジン層8を除いて作製したコレステロールセンサの応答と比較して明らかに高い値を得た。

【0010】[実施例2] バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。図3は本発明のバイオセンサの一実施例として作製したグルコースセンサのうちカバーおよびスペーサーを除いた断面模式図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1上に、実施例1と同様にしてリード、絶縁層および電極系を形成する。次に、CMCとイオン性高分子のポリオルニチンとの混合水溶液を電極系上に滴下し、乾燥させてポリオルニチンとCMCからなる層15を形成する。このように親水性高分子とイオン性高分子の混合溶液を一度に滴下し、乾燥させることによって製造工程を簡略化させることができる。次に、前記ポリオルニチンとCMCからなる層15上に、酵素としてのグルコースオキシダーゼ（EC1.1.3.4；以下GODと略す）と電子受容体としてのフェリシアン化カリウムをリン酸緩衝液に溶解させた混合水溶液を展開し、乾燥させてGODとフェリシアン化カリウムを含む層16を形成する。

【0011】さらに、前記GODとフェリシアン化カリウムを含む層16を覆うようにして、分散剤としてのレシチンの0.5wt%トルエン溶液を滴下し、乾燥させることによってレシチン層17を形成する。以上のようにしてグルコースセンサの反応層を形成する。前記レシチ

ン層17を形成することにより、センサへの試料液の導入をより円滑にすることが可能であるが、必要に応じて省略することもできる。レシチン層17を省略した場合においても、本発明の効果に何等影響を与えるものではない。最後に、実施例1と同様にスペーサー11およびカバー12と一体化してグルコースセンサを構成する。このようにして作製したグルコースセンサは、迅速かつ高精度な応答を示し、また実施例1同様、ポリオルニチンを含まない従来のセンサと比較して、安定した応答特性を示した。

【0012】[実施例3] バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。図4は本発明のバイオセンサの一実施例として作製したグルコースセンサのうちカバーおよびスペーサーを除いた断面模式図である。実施例1または実施例2と同様にして、ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1上に、リード、絶縁層および電極系を形成する。次に、イオン性高分子としてのポリリジンの0.1wt%水溶液を電極系上に滴下し、50℃の温風乾燥器中で10分間乾燥させてポリリジン層8を形成する。次に、実施例2と同様にしてこのポリリジン層8上に、GODとフェリシアン化カリウムをリン酸緩衝液に溶解させた混合水溶液を展開し、乾燥させてGODとフェリシアン化カリウムを含む層16を形成する。つぎに、実施例2と同様にして、レシチン層17を形成する。

【0013】以上のようにしてグルコースセンサの反応層を形成し、さらに、実施例1または実施例2と同様に、スペーサー11およびカバー12と一体化してグルコースセンサを作製する。上記グルコースセンサに、試料液としてグルコース水溶液を供給し、1分後に対極を基準にして測定極にアノード方向へ+0.5Vのパルス電圧を印加し、5秒後の電流値をセンサ応答として測定、評価したところ、ポリリジン層を除いて作製したグルコースセンサと比較して高精度な応答特性を示した。

【0014】なお、上記実施例ではカバーおよびスペーサーとともに一体化した構造のバイオセンサについて述べたが、これらは必ずしも必要ではなく、カバーおよびスペーサーを除いてバイオセンサを作製した場合には、試料液を直接あるいは保水性の材料等を介して間接的に反応層へ供給してやればよい。カバーおよびスペーサーを設置した構成に関しては、実施例中に述べた効果以外に次のような効果を得ることもできる。すなわちカバーおよびスペーサーを設置すると、絶縁性の基板とによって電極系上部に空間部が形成される。前記空間部の壁面に相当する部位の適当な位置に、酵素あるいは必要に応じて電子受容体を担持することが可能となる。バイオセンサに供給された試料液は前記空間部を満たすため、酵素等の試薬は試料液に溶解、拡散して実施例中に記載した反応が起こる。酵素等は他の試薬と混合させることによって機能の低下、特性変化が生じる場合もあるため、

適当な位置に分散して形成することは保存信頼性を高めるためには効果的である。

【0015】上記実施例においては、イオン性高分子としてポリリジン、ポリオルニチンを用いたが、これらに限定されるものではなく、ポリアルギニン等、溶液中で陽イオン性の性質を示すポリマーなら何れを用いても同様の効果が得られる。また、陽イオン性の電子受容体を用いたセンサにおいては、溶液中で陰イオン性の性質を示すイオン性高分子層を形成することにより同様の効果を得ることができる。この場合に用いる陰イオン性の高分子は、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸等、溶液中で陰イオン性の性質を示すものなら何れでもよい。また、上記実施例においては、親水性高分子としてCMCを用いたが、これに限定されることはなく、ビニルアルコール系、セルロース系、ビニルピロリドン系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、デンプン系、無水マレイン酸系、アクリルアミド系の高分子、メタクリレート樹脂などをそれぞれ用いても同様の効果が得られ、これらの親水性高分子に適した陽イオン性または陰イオン性高分子を選んで用いることができる。

【0016】一方、上記実施例においては、電子受容体の還元体を電極系で酸化させる測定方法について述べたが、必ずしも電子受容体を反応層中に含有する必要はなく、コレステロールの酸化にともなって生成する過酸化水素を電極系で酸化させることによってコレステロール濃度を定量することも可能である。また、上記実施例では、測定極と対極のみの二極電極系について述べたが、参照極を加えた三電極方式にすれば、より正確な測定が可能である。さらに、電子受容体としては、上記実施例に示したフェリシアン化カリウム以外にβ-ナフトキノンスルホン酸カリウム、メチレンブルー、チオニン、トルイジンブルー、p-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェート、フェロセンおよびその誘導体なども使用でき、電子受容体が電荷を帯びている場合それぞれの電子受容体に適した陰イオン性または陽イオン性高分子を選んで用いることで上記実施例と同様の効果が得られる。また、親水性高分子層が電極系上に設置されていない場合においても、電極の材料によっては電極表面に電荷を帯びた官能基が形成される可能性があり、その影響を緩和するよう適切に選択されたイオン性高分子層を形成することで、応答値の増加、安定化が得られる。

【0017】一方、緩衝液としてはリン酸緩衝液を用いたが、これに限定されることはなく、クエン酸塩を用いた緩衝剤など、用いる酵素の活性が発現し得る範囲内で自由に緩衝液を選択することができる。また、緩衝剤の

有無は本発明の効果に影響を与えるものではなく、必ずしも必要ではない。さらに、上記実施例ではコレステロールセンサとグルコースセンサについて示したが、本発明はアルコールセンサやスクロースセンサ、乳酸センサ、フルクトースセンサなど酵素の関与する反応系に広く用いることができる。酵素としてはコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼに限定されることはなく、アルコールオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ等を用いることができる。

【0018】

【発明の効果】以上のように、本発明によれば、酵素と相互作用した電子受容体が電荷を帯びている場合、電極表面に電子受容体と反対の電荷を帯びた高分子層を形成することにより、応答電流値の増加をもたらす、測定に必要な時間を短縮する。さらに、個々のセンサの応答値のばらつきも小さくすることができる。

【図面の簡単な説明】

20 【図1】本発明のバイオセンサの一実施例として作製したコレステロールセンサのカバーおよびスペーサを除いた断面図である。

【図2】同コレステロールセンサのうち反応層を除いた分解斜視図である。

【図3】本発明のバイオセンサの別の実施例として作製したグルコースセンサのカバーおよびスペーサを除いた断面模式図である。

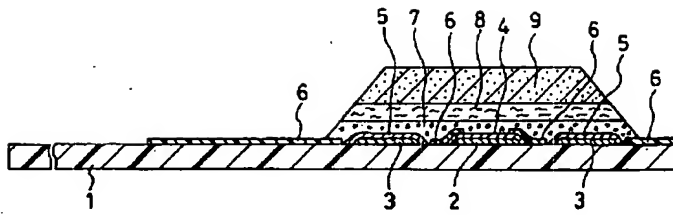
30 【図4】本発明のバイオセンサのさらに別の実施例として作製したグルコースセンサのカバーおよびスペーサを除いた断面模式図である。

【図5】従来例におけるバイオセンサの断面模式図である。

【符号の説明】

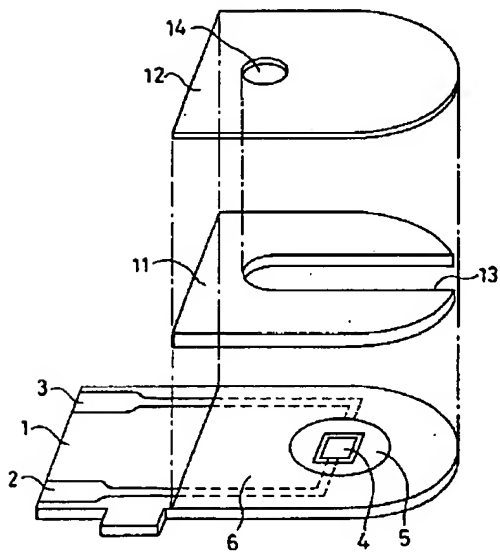
- 1 絶縁性の基板
- 2、3 リード
- 4 測定極
- 5 対極
- 6 絶縁層
- 7 親水性高分子層
- 40 8 イオン性高分子層
- 9 酵素および電子受容体を含む層
- 11 スペーサー
- 12 カバー
- 13 試料供給孔
- 14 空気孔

【図1】

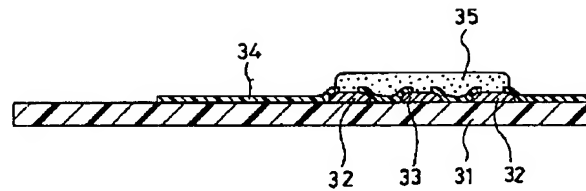


- |           |             |
|-----------|-------------|
| 1: 絶縁性の基板 | 6: 絶縁層      |
| 2,3: リード  | 7: 親水性高分子層  |
| 4: 測定極    | 8: イオン性高分子層 |
| 5: 対極     | 9: 酵素等を含む層  |

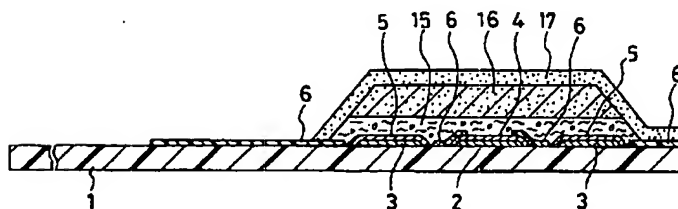
【図2】



【図5】



【図3】



特開平7-103933

(72)発明者 南海 史朗  
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内